

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/027142 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07K 14/47, C12N 5/10,
15/12, 15/63, C12Q 1/02, G01N 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/09626

(22) 国際出願日: 2002 年 9 月 19 日 (19.09.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-288278 2001 年 9 月 21 日 (21.09.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松本 俊一郎 (MATSUMOTO, Shunichiro) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 高崎 淳 (TAKASAKI, Jun) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 鞍馬 岳史 (KURAMA, Takeshi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 齋藤 哲 (SAITO, Tetsu) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 蒲原 正純 (KAMOHARA, Masazumi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社

内 Ibaraki (JP). 曾我 孝利 (SOGA, Takatoshi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 比山 英樹 (HIYAMA, Hideki) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 長井 省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR

(54) 発明の名称: 新規 G 蛋白質共役型受容体

(57) Abstract: A gene encoding a novel G protein-coupled receptor, which is required in developing preventives and/or remedies for eating disorder or obesity, is isolated and identified and an expression production system of this receptor is constructed. Thus, a screening method for searching for a substance controlling the receptor activity, which is useful in preventing and/or treating eating disorder or obesity, is provided.

(57) 要約:

摂食障害又は肥満症の予防及び／又は治療剤の開発に必要な、新規な G タンパク質共役型レセプターをコードする遺伝子を単離及び同定し、前記レセプターの発現生産系を構築し、摂食障害又は肥満症の予防及び／又は治療に有用な前記レセプター一活性を制御する物質を探索するためのスクリーニング法を提供する。

明 細 書

新規G蛋白質共役型受容体

技術分野

本発明は、新規G蛋白質共役型受容体に関する。

背景技術

医学的に重要な生物学的プロセスの多くが、Gタンパク質を含めたシグナル伝達経路に関与しているタンパク質及び／又はセカンドメッセンジャーにより媒介されることはよく知られている (Lefkowitz, Nature, 351, 353-354, 1991)。その中でも、三量体型GTP結合タンパク質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜レセプター群は、「Gタンパク質共役型レセプター」と総称されている。現在までに知られている全てのGタンパク質共役型レセプターは、アミノ末端を細胞外に、カルボキシル末端を細胞内とし、細胞膜を7回貫通する構造を共有するスーパーファミリーを形成していることから、「7回膜貫通型レセプター」と総称される場合もある。Gタンパク質共役型レセプターは、様々な生理活性物質の情報を、三量体型GTP結合タンパク質の活性化、そして、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して、細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型GTP結合タンパク質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介するcAMP、あるいは、フォスホリパーゼCを介するCa²⁺などがよく知られているが、三量体型GTP結合タンパク質を介したチャネルの制御、そして、リン酸化酵素の活性化など、多くの細胞タンパク質がその標的となっていることが最近明らかとなってきた (Gudermann, T. ら, Annu. Rev. Neurosci., 20, 399-427, 1997)。Gタンパク質共役型レセプターを介して情報を伝達する生理活性物質の中には、神経伝達物質、ホルモン、ケモカイン、脂質由来の情報伝達物質、2価イオン、又はプロテアーゼなど、既存の生理活性物質の多くが含まれる。これらの生理活性物質にはそれぞれ特異的なGタンパク質共役型レセプターが存在し、その情報を細胞内に伝達する。

Gタンパク質共役型レセプターは、遺伝子のクローニングが先行する場合も多く、

内在性リガンドとの対応がとれていないレセプターは、オーファンGタンパク質共役型レセプターと呼ばれている。近年、充実された化合物ライブラリーと高性能ハイスループットスクリーニングとを組み合わせることで、オーファンGタンパク質共役型レセプターをターゲットとした薬剤の創製が提唱されている(①Stadel, J. ら, Trends Pharmacol. Sci., 18, 430-437, 1997)。すなわち、多くのGタンパク質共役型レセプターのセカンドメッセンジャーとなっているcAMP又は Ca^{2+} の測定、三量体型GTP結合タンパク質の活性化の指標となるGTPase活性、あるいは、GTP γ SのGタンパク質結合測定などをハイスループット化することで、化合物ライブラリーからオーファンGタンパク質共役型レセプターに対するアゴニストをスクリーニングすることが可能であり、その化合物を利用した特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発が可能であるということである。このような状況下では、新しい疾患の治療ターゲットとなり得る新規Gタンパク質共役型レセプターの発見が、Gタンパク質共役型レセプターに作用する薬剤創製の最も重要なステップと見なすことができる。

現在までに数百種類のGタンパク質共役型レセプターが真核生物からクローニングされている。ヒトに関しては百種類以上の内在性リガンドとの対応がとれたGタンパク質共役型レセプターがクローニングされている。これまでにそれらの受容体をターゲットとする数百種類もの疾患治療薬が利用されている(Wilson, J. ら, British J. of Pharmacol., 125, 1387-1392, 1998)。Gタンパク質共役型レセプターが標的となっている疾患は多岐にわたり、中枢神経系、循環器系、炎症免疫系、消化器系、運動器系、又は泌尿器生殖器系それぞれの分野でGタンパク質共役型レセプターに作用する有効な薬剤が存在する(前述①Stadel, J. ら)。このことは、Gタンパク質共役型レセプターのアゴニスト又はアンタゴニストが疾患の治療剤となる可能性が高いことを示唆し、各種疾患を予防、改善、又は治療する上で重要な役割を果たすと考えられる新たな受容体を同定し、疾患との関わりを解明する必要がある。

ところで、摂食亢進物質として、ニューロペプチドY(neuropeptide Y;以下、NPYと略称する)、ペプチドYY(PYY)、及び膵臓ペプチド(pancreatic polypeptide;PP)が知られており[Biochem. Cell. Biol., 78, 371-92, 2000;Am. J. Physiol., 259(2 Pt 2), R317-23, 1990;Brain Res., 341, 200-3, 1985;Brain Res., 805, 20-8, 1998;

Physiol. Behav., 58, 731-5, 1995; 及び Am. J. Physiol., 269 (5 Pt 2), R983-7, 1995]、これら3種は、NPYファミリーを構成している。

NPYファミリーの機能発現は、NPY特異的受容体との結合を介して行なわれる(② Blomqvist, A. G. 及び Herzog, H., Trends Neurosci., 20, 294-8, 1997)。NPYファミリーの受容体としては、これまで5つの異なるサブタイプが存在することが知られており、Gタンパク質共役型受容体(GPCR) Y1、Y2、Y4、Y5、及びY6が遺伝子レベルで同定されている。Y1受容体は、抹消組織では血管に発現しており、NPYとの結合により血管収縮を惹起する。一方、Y5受容体は、組織発現分布解析から、摂食に対する関与が示唆されている(前述②Blomqvist, A. G. ら)。

NPYのGPCRは、摂食障害(前述②Blomqvist, A. G. ら)の治療ターゲットであると考えられており、NPYファミリー阻害剤である、1229U91、BMS-192548、J-104870、及び BIBP3226等について、抗肥満薬の研究が進められている

[J. Pharmacol. Exp. Ther., 275, 1261-6, 1995; J. Antibiot. (Tokyo), 48, 1055-9, 1995; Biochem. Biophys. Res. Commun., 266, 88-91, 1991; 及び J. Pharmacol. Exp. Ther., 275, 136-42, 1995]。しかしながら、摂食調節の異常に起因する摂食障害、又は肥満症等の疾患に関与するGタンパク質共役型レセプターとそれに作用する分子について全てが理解されたわけではない。

発明の開示

本発明の課題は、摂食障害又は肥満症の予防及び／又は治療剤の開発に必要な、新規なGタンパク質共役型レセプターをコードする遺伝子を単離及び同定し、前記レセプターの発現生産系を構築し、摂食障害又は肥満症の予防及び／又は治療に有用な前記レセプター活性を制御する物質を探索するためのスクリーニング法を提供することにある。また、本発明の課題は、摂食作用は抑制するが、摂食以外の作用に影響を与えない物質をスクリーニングするための方法を提供することにある。

本発明者は、鋭意研究を行なった結果、GPCRであるGPRg1をコードし、摂食機能を司る視床下部特異的に発現している配列番号1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドを取得した。そして、GPRg1のセカンドメッセンジャーは、Ca²⁺上昇及び／又はcAMP抑制であることを見出し、GPRg1を用いた摂食作用を抑制する物質の

スクリーニング系を提供した。また、GPRg1 に結合するリガンドが結合する GPCR であり、視床下部及び摂食機能に関連しない様々な組織で発現している GPRg1b 並びにこれをコードするポリヌクレオチドを取得した。そして、GPRg1 と GPRg1b を用い、GPRg1 活性に影響を与えるが、GPRg1b 活性に影響を与えない物質をスクリーニングすることにより、摂食機能のみを特異的に制御する、摂食障害及び／又は肥満症の予防及び／又は治療に有用な物質をスクリーニングするための方法を提供し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、

- [1] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、(a)細胞において活性化されることにより、前記細胞内 Ca^{2+} 量を増加させる活性、及び／又は(b)細胞において活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を減少させる活性を示すポリペプチド、あるいは、
- (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列の1～5個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、(a)細胞において活性化されることにより、前記細胞内 Ca^{2+} 量を増加させる活性、及び／又は(b)細胞において活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を減少させる活性を示すポリペプチド、
- [2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- [3] 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- [4] [1]～[3]のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- [5] [4]に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、
- [6] [5]に記載のベクターを含む細胞、
- [7] [6]に記載の細胞を培養する工程を含むことを特徴とする、[1]～[3]のいずれか一項に記載のポリペプチドを製造する方法、
- [8] [1]又は[2]に記載のポリペプチドを発現している細胞又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む前記ポリペプチドの活性を制御できる物質をスクリーニングする方法、

- [9] (1) [1]又は[2]に記載のポリペプチドを発現している細胞又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、および、
- (2) [3]に記載のポリペプチドを発現している細胞又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む、[1]又は[2]に記載のポリペプチドの活性を制御できる物質であって、しかも、[3]に記載のポリペプチドの活性に影響を与えない物質をスクリーニングする方法、
- に関する。

図面の簡単な説明

図1はGPRg1タンパク質のレポーター活性を示すグラフである。得られた結果のルシフェラーゼ活性値をY軸に示す。

記号「Gqi5」は、プラスミドpEF-BOS-Gqi5を用いた場合の結果を意味し、記号「Gqo」は、プラスミドpEF-BOS-Gqoを用いた場合の結果を意味し、記号「Gqs」は、プラスミドpEF-BOS-Gqsを用いた場合の結果を意味し、記号「Gq」は、プラスミドpEF-BOS-Gqを用いた場合の結果を意味し、記号「G15」は、プラスミドpEF-BOS-G15を用いた場合の結果を意味する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のポリペプチドとしては、具体的には、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(以下、GPRg1タンパク質と称することがある)；
- (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、(a)細胞において活性化されることにより、前記細胞内 Ca^{2+} 量を増加させる活性(以下、細胞内 Ca^{2+} 増加活性と称することがある)、及び／又は(b)細胞において活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を減少させる活性(以下、細胞内cAMP減少活性と称することがある)を示すポリペプチド；

- (3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所(好ましくは1~3箇所、特に好ましくは1箇所)において、全体として1~5個、更に好ましくは1~3個、特に好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、(a)細胞内Ca²⁺増加活性、及び/又は(b)細胞内cAMP減少活性を示すポリペプチド(以下、GPRg1タンパク質機能的等価改変体と称する);あるいは、
- (4) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、(a)細胞内Ca²⁺増加活性、及び/又は(b)細胞内cAMP減少活性を示すポリペプチド(以下、GPRg1タンパク質相同ポリペプチドと称する)
- を挙げることができる[以下、これらのポリペプチド(1)~(4)を総称して、「GPRg1タンパク質群」と称する]。

更に、本発明のポリペプチドとしては、具体的には、

- (5) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(以下、GPRg1bタンパク質と称することがある);
- (6) 配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合するポリペプチド;
- (7) 配列番号4で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所(好ましくは1~3箇所、特に好ましくは1箇所)において、全体として1~5個、更に好ましくは1~3個、特に好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合するポリペプチド(以下、GPRg1bタンパク質機能的等価改変体と称する);あるいは、
- (8) 配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合するポリペプチド(以下、GPRg1bタンパク質相同ポリペプチドと称する)
- を挙げることができる[以下、これらのポリペプチド(5)~(8)を総称して、「GPRg1bタンパク質群」と称する]。

本発明のポリペプチドの1つであるGPRg1タンパク質、すなわち、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」は、353個のアミノ酸残基からなるヒト由来のGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。GPRg1タンパク質は、後述の実施例4に示すように、摂食機能を司る視床下部に発現しており、摂食機能を司るGPCRであ

る。

本願優先日後に公開されたW001/94582(2001年12月13日公開)には、配列番号2で表されるアミノ酸配列が記載されている。しかし、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを取得したことは記載されておらず、本ポリペプチドが摂食機能を司ることは開示も示唆もない。また、本願優先日後に公開されたW001/70978(2001年9月27日公開)には、配列番号2で表されるアミノ酸配列と1アミノ酸異なる配列が記載されている。しかし、該配列からなるポリペプチドを取得したこと及び本ポリペプチドの現実的な用途は記載されておらず、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが摂食機能を司ることは開示も示唆もない。

GPRg1タンパク質は、後述の実施例5に示すように、セカンドメッセンジャーが Ca^{2+} 上昇及び／又はcAMP抑制であるGPCRであり、細胞内 Ca^{2+} 増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示す。

本明細書において、或るポリペプチドが「細胞内 Ca^{2+} 増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性」を示すか否かは、特に限定されるものではないが、例えば、以下の方法(好ましくは、後述の実施例5に記載の方法)により確認することができる。

すなわち、(1)試験ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、(2) $G\alpha$ タンパク質の一種である G_q と G_i とのキメラタンパク質(例えば、 G_{qi5})、又は G_q をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、(3)血清応答配列(serum response element;SRE)の下流にレポーター遺伝子(例えば、ルシフェラーゼ)を連結したプラスミドとを、動物細胞(例えば、HEK293-EBNA細胞)に3者同時に遺伝子導入した後、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定する。この際、コントロールとして、(1)試験ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含まないコントロール用ベクターと、(2) G_q と G_i とのキメラタンパク質、又は G_q をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、(3)SREの下流にレポーター遺伝子を連結したプラスミドとを、3者同時に遺伝子導入した動物細胞においても、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定する。

コントロール用発現ベクターを遺伝子導入した細胞に比べて、試験ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを遺伝子導入した細胞におけるルシフェラーゼ活性が上昇していれば、前記試験ポリペプチドが「細胞内 Ca^{2+} 増加活

性及び／又は細胞内cAMP減少活性」を示す、すなわち、「細胞において活性化されることにより、前記細胞内Ca²⁺量を増加させる活性、及び／又は前記細胞内cAMP量を減少させる活性」を示すと判定することができる。

なお、前記「Gq」は、受容体と共役して細胞内へのシグナル伝達・増幅因子として機能するGタンパク質のサブファミリーの1つであって、ホスホリパーゼCの活性を促進するGタンパク質である。ホスホリパーゼCの活性が促進されると、例えば、細胞内Ca²⁺濃度が上昇する。

また、前記「Gi」は、受容体と共役して細胞内へのシグナル伝達・増幅因子として機能するGタンパク質のサブファミリーの1つであって、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制するGタンパク質である。アデニル酸シクラーゼの活性が抑制されると、例えば、細胞内cAMP濃度が低下する。

また、本明細書において、新規Gタンパク質共役型受容体である本発明のポリペプチドが細胞において「活性化」された状態とは、リガンドとの結合の有無に関わらず、Gタンパク質共役型受容体の下流にシグナルが伝達されている状態を意味する。活性型Gタンパク質共役型受容体の絶対量が一定量を越えた場合に、本発明のポリペプチドは活性化される。

Gタンパク質共役型受容体は、不活性型と活性型との間の平衡状態にあり、リガンドがGタンパク質共役型受容体に結合することにより、平衡が活性型にシフトする。Gタンパク質共役型受容体を過剰に発現させた場合にも、活性型Gタンパク質共役型受容体の絶対量が増えるため、リガンド非存在下であっても、活性化され、下流にシグナルが伝達されることが知られている(Milano, C. A. ら, Science, 264, 582-586, 1994)。すなわち、Gタンパク質共役型受容体は、リガンドが特定されていない場合であっても、Gタンパク質共役型受容体を細胞に過剰発現させることにより、その受容体からのシグナルを検出することが可能な場合がある。後述の実施例5に記載の実験では、本発明のポリペプチドに対するリガンド非存在下であっても、本発明のポリペプチドを過剰発現させることにより、アゴニストの結合による活性化と同じ状態に活性化されている。

本発明による、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示すポリペプチド」には、例えば、配列

番号2で表されるアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等を付加したポリペプチド(但し、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示すことが必要)を挙げることができる。

本発明において用いることのできるマーカー配列としては、ペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

本発明のGPRg1タンパク質群の起源は、ヒトに限定されない。例えば、本発明のGPRg1タンパク質機能的等価改変体には、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける天然のアレル変異体(但し、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示す)、あるいは、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)などのアミノ酸置換で生じたポリペプチド(但し、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示す)が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物[例えば、ヒト以外の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ)]由来の天然に存在する機能的等価改変体が含まれる。また、これらの天然のポリペプチド、特に、配列番号2で表されるアミノ酸配列を基にして遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれる。

本発明のGPRg1タンパク質相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、本発明のGPRg1タンパク質相同ポリペプチドとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示すポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLASTパッケージ[sgi32bit版, バージョン2.0.12; National Center for Biotechnology Information (NCBI) より入手]のbl2seqプログラム(Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol Lett., 174, 247-250, 1999)のデフォルトパラメーターを用いて得られた値を意味する。なお、デフォルトパラメーターでは、ペアワイズアラインメントパラメーターとして、

「プログラム名」として「blastp」を、
「Gap挿入Cost値」を「0」で、
「Gap伸長Cost値」を「0」で、
「Query配列のフィルター」として「SEG」を、
「Matrix」として「BLOSUM62」を、
それぞれ使用する。

本発明には、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分断片であって、しかも、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示す部分断片も含まれる。

本発明のポリペプチドの1つであるGPRg1bタンパク質、すなわち、「配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」は、374個のアミノ酸残基からなるヒト由来のGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。GPRg1bタンパク質は、後述の実施例4に示すように、摂食機能を司る視床下部以外にも、様々な組織で発現している。

GPRg1bタンパク質は、後述の実施例3に示すように、前記GPRg1タンパク質と高い相同性(46%)を有しており、GPRg1タンパク質及びGPRg1bタンパク質には、生体内の同一生理活性物質が結合すると考えられる。

本発明による、「配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合するポリペプチド」には、例えば、配列番号4で表されるアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等を付加したポリペプチド(但し、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合することが必要)を挙げることができる。

本願優先日後に公開されたW002/06466(2002年1月24日公開)には、配列番号4で表されるアミノ酸配列が記載されている。しかし、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを取得したことは記載されておらず、産業上の利用可能性としては、リガンドの決定、抗体および抗血清の入手、組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築等の漠然とした用途が記載されているに過ぎず、摂食作用を特異的に抑制する物質のスクリーニングに有用であることは開示も示唆もない。

本発明において用いることのできるマーカー配列としては、ペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いること

ができ、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサ-ヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げるができる。

本発明のGPRg1bタンパク質群の起源は、ヒトに限定されない。例えば、本発明のGPRg1bタンパク質機能的等価改変体には、例えば、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける天然のアレル変異体(但し、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合することが必要)、あるいは、一塩基多型(SNP)などのアミノ酸置換で生じたポリペプチド(但し、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合することが必要)が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物[例えば、ヒト以外の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ)]由来の天然に存在する機能的等価改変体が含まれる。また、これらの天然のポリペプチド、特に、配列番号4で表されるアミノ酸配列を基にして遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれる。

本発明のGPRg1bタンパク質相同ポリペプチドは、配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合するポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、本発明のGPRg1bタンパク質相同ポリペプチドとしては、配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合するポリペプチドが好ましい。

本発明には、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分断片であって、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合する部分断片も含まれる。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではない。本発明のポリヌクレオチドには、具体的には、

「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(GPRg1タンパク質)」をコードするポリヌクレオチド;

「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示すポリペプチド」をコードするポリヌクレオチド;

「GPRg1タンパク質機能的等価改変体」をコードするポリヌクレオチド；
「GPRg1タンパク質相同ポリペプチド」をコードするポリヌクレオチド；
「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分断片であって、しかも、細胞内Ca²⁺増加活性及び／又は細胞内cAMP減少活性を示すポリペプチド」をコードするポリヌクレオチド；
「配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(GPRg1bタンパク質)」をコードするポリヌクレオチド；
「配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合するポリペプチド」をコードするポリヌクレオチド；
「GPRg1bタンパク質機能的等価改変体」をコードするポリヌクレオチド；
「GPRg1bタンパク質相同ポリペプチド」をコードするポリヌクレオチド；あるいは、
「配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分断片であって、しかも、GPRg1及びGPRg1bに結合する生体内生理活性物質が結合するポリペプチド」をコードするポリヌクレオチド
が含まれる。

本発明のポリヌクレオチドとしては、配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが好ましく、配列番号1又は3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドがより好ましい。

なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1)PCRを用いた方法、(2)常法の遺伝子工学的手法(すなわち、cDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望のcDNAを含む形質転換株を選択する方法)を用いる方法、又は(3)化学合成法などを挙げることができる。以下、各製造方法について、順次、説明する。

PCRを用いた方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドを産生する能力を有するヒト細胞又は組織(例えば、脳・視床下部又は胎児脳)からmRNAを抽出する。次いで、本発明のポリペプチド

をコードするポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて、本発明のポリペプチドに相当するmRNAの全長を挟むことのできる2個1組のプライマーセット、あるいは、その一部のmRNA領域を挟むことのできる2個1組のプライマーセットを作成する。逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行なうことにより、本発明のポリペプチドの全長cDNA又はその一部を得ることができる。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

まず、前記のPCRを用いた方法で調製したmRNAを鋳型として、逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。

次に、前記2本鎖cDNAを含む組換えプラスミドを作製した後、大腸菌(例えば、DH5 α 株)に導入して形質転換させ、例えば、テトラサイクリン又はアンピシリンに対する薬剤耐性を指標として、組換え体を選択する。

このようにして得られる形質転換株から、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する方法としては、例えば、以下に示す(1)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法、(2)PCRにより作製したプローブを用いるスクリーニング法を採用することができる。

合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの全部又は一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブ(^{32}P 又は ^{33}P で標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。なお、プローブ用のオリゴヌクレオチドを合成する場合には、コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列とすることもできるし、あるいは、考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列とすることもできる。後者の場合には、イノシンを含ませてその種類を減らすことができる。

PCRにより作製したプローブを用いるスクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの一部に対応するセンスプライマー及びアンチ

センスプライマーの各オリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてPCRを行ない、目的ポリペプチドの全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、本発明のポリペプチドを産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、又はゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNA断片を、例えば、 ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション又はプラークハイブリダイゼーションを行なうことにより、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明のポリヌクレオチドを採取する方法は、公知の方法(例えば、③Maniatis, T. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982)に従って実施することができる。例えば、細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、得られたプラスミドDNAからcDNA領域を切り出すことにより行なうことができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。各DNAは、DNA合成機[例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、又は394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製)など]を用いて合成することができる。

また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの情報に基づいて、例えば、ホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M ら, Nature, 10, 105-111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、常法に従って決定することができる(Crantham, R ら, Nucleic Acids Res., 8, r43-r74, 1981)。更に、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的突然変異誘発法(site specific mutagenesis) (Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984)等により実施することができる。

これまで述べた種々の方法により得られるDNAの配列決定は、例えば、マキシムーギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. 及びGilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980)やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. 及びVieira, J., Gene,

19, 269-276, 1982)等により行なうことができる。

単離された本発明のポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、宿主細胞(好ましくは真核生物、特に好ましくは293-EBNA細胞)を形質転換させることができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

本発明者は、本発明のポリペプチドのN末端にシグナルシーケンスを付加することが可能な発現ベクターを用いることにより、本発明のポリペプチドを細胞膜に過剰発現させることを可能とした。本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

また、本発明者は、293-EBNA細胞を用いることにより、本発明のポリペプチドを細胞膜に過剰発現させることを可能とした。本発明の細胞も、本発明の前記発現ベクターで形質転換され、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、本発明のポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、本発明によるポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。また、本発明のポリペプチドを発現している細胞であることもできるし、あるいは、本発明のポリペプチドを発現していない細胞であることもできる。本発明の細胞は、例えば、本発明の発現ベクターにより、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、及び酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Urlaub, G. 及び Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、及び前記HEK293細胞にエプスタイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞(Invitrogen社)等を挙げることができる。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとするポリヌクレオチド

の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有していることができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S.ら, Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有するpEF-BOS (④Mizushima, S. 及びNagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、サイトメガロウイルスプロモーターを有するpCEP4 (Invitrogen社)等を挙げることができる。また、発現しようとするポリペプチドの上流に、細胞外への分泌シグナル配列(シグナルシーケンス)、例えば、インフルエンザヘマグルチニンシグナルシーケンスをインフレームで融合することができるようデザインした発現ベクターを用いることもできる

(J. Biol. Chem., 267, 21995-21998, 1992)。このような発現ベクターとして、例えば、前記pEF-BOSに、シグナルシーケンス及びFLAGエピトープをコードする配列を導入したプラスミド(pEF-BOS signal sequence flag plasmid)を用いることができる。

宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、エプスタイン・バーウイルスの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4 (Invitrogen社)などを用いることができる。

また、宿主細胞としてCOS細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、更に、転写プロモーター、転写終結シグナル、及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. 及びTakebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (前述④Mizushima, S. ら)、又はpCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987)等を挙げることができる。

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. 及びMagnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. 及びvan der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、市販の遺伝子導入試薬(例えば、FuGENE™6 Transfection Reagent; Roche Diagnostics社製)を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法 (Neuman, E. ら, EMBO J., 1, 841-845, 1982)等により、COS細胞に取り込ませることができる。

更に、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、本発明のポリペプチドをコード

するポリヌクレオチドを含む発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo (Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 又はpSV2-neo (Southern, P. J. 及びBerg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、本発明のポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

本発明の細胞は、常法に従って培養することができ、前記培養により細胞表面に本発明のポリペプチドが生産される。前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、COS細胞の場合には、例えば、RPMS-1640培地又はダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清(FBS)等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293-EBNA細胞の場合には、牛胎仔血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えた培地を使用することができる。

本発明の細胞を培養することにより、前記細胞の細胞表面に生産される本発明のポリペプチドは、前記ポリペプチドの物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離精製することができる。具体的には、例えば、本発明のポリペプチドを表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁した後、ホモジナイズし、遠心分離することにより、本発明のポリペプチドを含む細胞膜画分を得ることができる。得られた細胞膜画分を可溶化した後、通常のタンパク質沈殿剤による処理、限外濾過、各種液体クロマトグラフィー[例えば、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等]、若しくは透析法、又はこれらの組合せ等により、本発明のポリペプチドを精製することができる。なお、細胞膜画分を可溶化する際には、できるだけ緩やかな可溶化剤(例えば、CHAPS, Triton X-100, 又はジキトニン等)を用いることにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

本発明のポリペプチドは、マーカー配列とインフレームで融合して発現させることにより、本発明のポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、又は精製等が

容易になる。前記マーカー配列としては、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサースチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。また、マーカー配列と本発明のポリペプチドとの間に、プロテアーゼ(例えば、エンテロキナーゼ、ファクターXa、又はトロンビンなど)が認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去することが可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とヘキサースチジン・タグとをトロンビン認識配列で連結した報告がある(Hayashi, M. K. 及びHaga, T., J. Biochem., 120, 1232-1238, 1996)。

本発明の細胞の内、GPRg1タンパク質群を発現している細胞、又はその細胞膜を用いると、本発明のGPRg1タンパク質群の活性を制御可能な物質をスクリーニングすることができる。本発明のポリペプチドの1つであるGPRg1タンパク質は、先に述べたように、摂食機能を司る視床下部に発現しており、摂食機能を司るGPCRであると考えられる。従って、GPRg1タンパク質の活性を制御することのできる物質は、摂食障害及び／又は肥満症の治療及び／又は予防剤の有効成分として有用である。従って、本発明の細胞の内、GPRg1タンパク質群を発現している細胞、又はその細胞膜それ自体を、摂食障害及び／又は肥満症治療用物質のスクリーニングツールとして使用することができる。以下、「GPRg1タンパク質群を発現している細胞」を、本発明のスクリーニング用細胞と称する。

本発明の摂食障害及び／又は肥満症治療用物質スクリーニングツールを用いてスクリーニングにかけることのできる試験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物(ペプチドを含む)、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995)によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法(Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験物質として用いることができる。更には、本発明の摂食障害及び／又は肥満症治療用物質スクリーニングツールにより選択された化合物(ペプチドを含む)を、化学的又は生物学的に修飾した化合物(ペプチドを含む)を用いることができる。

本発明の摂食障害及び／又は肥満症治療用物質スクリーニング方法は、受容体として機能するように本発明のGPRg1タンパク質群(好ましくはGPRg1タンパク質)を発現している細胞又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び前記GPRg1タンパク質群が活性化されるか否かを分析する工程を含む限り、特に限定されるものではないが、例えば、GqとGiとのキメラタンパク質(例えば、Gqi5)、又はGqを利用するスクリーニング方法を挙げることができる。

GqとGiとのキメラタンパク質、又はGqを利用して、摂食障害及び／又は肥満症治療剤の有効成分として有用な、本発明のGPRg1タンパク質群の活性を制御する物質をスクリーニングする場合には、本発明のスクリーニング用細胞として、例えば、(1) GPRg1タンパク質群をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、(2) G α タンパク質の一種であるGqとGiとのキメラタンパク質(例えば、Gqi5)、又はGqをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、(3) 血清応答配列(SRE)の下流にレポーター遺伝子(例えば、ルシフェラーゼ)を連結したプラスミドとを、3者同時に遺伝子導入した動物細胞(例えば、HEK293-EBNA細胞)を用いることができる。

前記の本発明のスクリーニング用細胞と、試験物質とを接触させ、前記細胞内のルシフェラーゼ活性を分析(すなわち、測定又は検出)することにより、GPRg1タンパク質群が活性化されるか否かを分析する。本発明のスクリーニング用細胞と試験物質とを接触させた場合に、前記細胞内のルシフェラーゼ活性が上昇すれば、前記試験物質は、本発明のGPRg1タンパク質群に対するアゴニストであると判定することができる。一方、本発明のスクリーニング用細胞と試験物質とを接触させた場合に、前記細胞内のルシフェラーゼ活性が抑制されれば、前記試験物質は、本発明のGPRg1タンパク質群に対するアンタゴニストであると判定することができる。

なお、コントロールとして、本発明のスクリーニング用細胞の代わりに、(1) GPRg1タンパク質群をコードするポリヌクレオチドを含まないコントロール用ベクターと、(2) GqとGiとのキメラタンパク質、又はGqをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、(3) SREの下流にレポーター遺伝子を連結したプラスミドとを、3者同時に遺伝子導入したコントロール用細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験物質によりこれらのコントロール用細胞内のルシフェラーゼ活性が上昇又は抑制しないことを確認することが好ましい。

GqとGiとのキメラタンパク質、又はGqを利用するスクリーニング方法は、より具体的には、後述の実施例5に示す条件に準じて実施することが好ましい。すなわち、コラーゲンタイプIをコーティングした24ウェルプレート(例えば、Collagen-TypeI-Coated 24 well plate;ASAHI TECHNO GLASS社)に、HEK293-EBNA細胞を1ウェル当たり 7×10^4 細胞となるように播種し、24時間培養した後、(1)プラスミドpEF-BOS-SSF-GPRg1又はプラスミドpEF-BOS(コントロールとしての空ベクター)(1ウェル当たり100ng)と、(2)各プラスミドpEF-BOS-Gqi5、pEF-BOS-Gqo、pEF-BOS-Gqs、pEF-BOS-Gq、又はpEF-BOS-G15のいずれか1種類のプラスミド(1ウェル当たり100ng)と、(3)プラスミドpSRE-luc (STRATAGENE社)(1ウェル当たり20ng)とを、遺伝子導入試薬(例えば、FuGENE™6 Transfection Reagent;Roche Diagnostics社製)を用いて、3者同時に遺伝子導入する。遺伝子導入直後に、あるいは、遺伝子導入から所定時間(例えば、18時間)経過した後に、試験物質を添加し、遺伝子導入から24時間経過した後、培地を廃棄し、ルシフェラーゼ・アッセイシステム(和光純薬社)の方法に従い、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定する。なお、使用した各プラスミドの詳細については、後述の実施例5を参照されたい。

また、前記GPRg1タンパク質群(好ましくはGPRg1タンパク質)を発現している細胞と併せて、本発明のGPRg1bタンパク質群(好ましくはGPRg1bタンパク質)を発現している細胞を用いると、GPRg1タンパク質群の活性を制御することのできる物質であって、しかも、GPRg1bタンパク質群の活性に影響を与えない(すなわち、GPRg1bタンパク質群の活性化及び阻害を行なわない)物質をスクリーニングすることができる。このような物質は、摂食機能のみを特異的に制御することができるため、摂食障害及び/又は肥満症治療用物質として、より好ましい物質である。

なお、GPRg1bタンパク質群の活性に影響を与えない物質は、例えば、GPRg1bタンパク質群を用いた結合実験により、GPRg1bタンパク質群に結合する物質を除外することによって選択することができる。

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断りのない場合には、公知の方法(前述③Maniatis, Tら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual")に従って、実施可能である。

《実施例1 新規GPCRタンパク質をコードする遺伝子の単離》

本発明の新規GPCRタンパク質(GPRg1及びGPRg1b)をコードする全長cDNAは、以下に示す手順に従って、PCRにより取得した。

まず、本発明の新規GPCRタンパク質GPRg1をコードするcDNAの増幅には、ヒト脳の視床下部由来のcDNAを鋳型として用いた。ヒト脳の視床下部由来の鋳型cDNAは、前記組織由来のmRNA(Clontech社)を購入し、逆転写反应用試薬(Super Script; GIBCO社)を用いて逆転写反応を行なうことにより調製した。また、フォワードプライマーとして、配列番号5で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして、配列番号6で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。PCRは、パイロベストDNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、5%ホルムアミド存在下で、94℃(2分間)の後、96℃(5秒間)及び72℃(1.5分間)からなるサイクルを5回、96℃(5秒間)及び70℃(1.5分間)からなるサイクルを5回、並びに96℃(5秒間)及び68℃(1.5分間)からなるサイクルを20回繰り返すことにより実施した。

その結果、約1.1kbpのDNA断片が増幅された。この断片をプラスミドpCR2.1(Invitrogen社)を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列を、ジデオキシターミネーター(dideoxy terminator)法により、DNAシーケンサー(ABI377 DNA Sequencer; Applied Biosystems社)を用いて解析したところ、配列番号1で表される塩基配列が得られた。

この塩基配列は、1062塩基からなるオープンリーディングフレーム(配列番号1で表される塩基配列の1番目～1062番目)を有する。このオープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列(アミノ酸残基数=353個)は、配列番号2で表されるアミノ酸配列である。得られた予想アミノ酸配列は、GPCRの特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がGPCRをコードすることが判明した。

本発明の新規GPCRタンパク質GPRg1bをコードするcDNAの増幅には、ヒト精巣由来のcDNA(Marathon Ready cDNA; Clontech社)を鋳型として用いた。また、フォワードプライマーとして、配列番号7で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、

リバースプライマーとして、配列番号8で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。PCRは、パイロベストDNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、94℃(2分間)の後、96℃(5秒間)及び72℃(1.5分間)からなるサイクルを5回、96℃(5秒間)及び70℃(1.5分間)からなるサイクルを5回、並びに96℃(5秒間)及び68℃(1.5分間)からなるサイクルを20回繰り返すことにより実施した。

その結果、約1.1kbpのDNA断片が増幅された。この断片をプラスミドpCR2.1 (Invitrogen社)を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列を、ジデオキシターミネーター法により、DNAシーケンサー(ABI377 DNA Sequencer; Applied Biosystems社)を用いて解析したところ、配列番号3で表される塩基配列が得られた。

この塩基配列は、1125塩基からなるオープンリーディングフレーム(配列番号1で表される塩基配列の1番目~1125番目)を有する。このオープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列(アミノ酸残基数=374個)は、配列番号4で表されるアミノ酸配列である。得られた予想アミノ酸配列は、GPCRの特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がGPCRをコードすることが判明した。

《実施例2 新規GPCRタンパク質(GPRg1及びGPRg1b)のアミノ酸配列でのSWISS-PROTに対するBLAST検索》

実施例1で得られた、本発明の新規GPCRタンパク質GPRg1のアミノ酸配列でのSWISS-PROTに対するBLAST(Basic local alignment search tool; S.F.Altschulら, J.Mol.Biol., 215, 403-410, 1990)検索を行なった。GPRg1タンパク質は、既知GPCRの中では、ノシセプチン(NOCICEPTIN)受容体(P47748;アミノ酸残基数=370個)に対して最も高い相同性(20%)を示したが、アミノ酸配列が同一の分子は存在しなかった。この結果から、GPRg1タンパク質が新規GPCRであることが判明した。

同様に、本発明の新規GPCRタンパク質GPRg1bのアミノ酸配列でのSWISS-PROTに対するBLAST検索を行なった。GPRg1bタンパク質は、既知GPCRの中では、B1ブラジキニン(B1 BRADYKININ)受容体(P48748;アミノ酸残基数=352個)に対して最も高い相同性(25%)を示したが、アミノ酸配列が同一の分子は存在しなかった。この結果から、

GPRg1bタンパク質が新規GPCRであることが判明した。

《実施例3 GPRg1タンパク質及びGPRg1bタンパク質のアラインメント解析》

GPRg1タンパク質及びGPRg1bタンパク質のアミノ酸配列での相同性を解析するために、BLASTパッケージ[sgi32bit版, バージョン2.0.12; National Center for Biotechnology Information (NCBI) より入手]のbl2seqプログラム (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol Lett., 174, 247-250, 1999) のデフォルトパラメーターに従って解析を行なった。[デフォルトパラメーターは既に9頁後半部分で説明済であることより、ここの箇所は削除しました。]

その結果、GPRg1タンパク質とGPRg1bタンパク質とは、46%と高い相同性を有することが判明した。GPRg1タンパク質及びGPRg1bタンパク質には、生体内の同一生理活性物質が結合すると考えられる。

《実施例4 ヒト組織におけるGPRg1遺伝子及びGPRg1b遺伝子の発現分布》

GPRg1遺伝子の組織発現分布を解析するために、実施例1と同様に、市販のヒト各組織由来のmRNA (Clontech社) を購入し、逆転写反应用試薬 (Super Script; GIBCO社) を用いて逆転写反応を行なうことにより、ヒト各組織由来cDNAを調製した。合成された各cDNAを鋳型とし、5%ジメチルスルホキシド (DMSO) 存在下で、Tag DNAポリメラーゼ (SIGMA) を用いてPCRを行なった。フォワードプライマーとして、配列番号9で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして、配列番号10で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。PCR条件は、94℃ (30秒間)、55℃ (30秒間)、及び72℃ (1分間) からなるサイクルを40回繰り返した。

その結果、約0.5kbpのDNA断片が、摂食機能を司ることが知られている視床下部、全脳、及び胎児脳に由来する各cDNAで増幅された。一方、脳梁、小脳、前頭葉、心臓、胎盤、肺、気管支、肝臓、骨格筋、腎臓、すい臓、小腸、胃、脾臓、骨髄、胸腺、甲状腺、唾液腺、副腎、乳腺、前立腺、精巣、子宮、胎児腎臓、胎児肝臓、及び胎児肺由来の各cDNAでは、増幅が確認されなかった。

GPRg1b遺伝子の組織発現分布を解析するために、GPRg1遺伝子の組織発現分布を解析するために先に調製したヒト各組織由来cDNAを鋳型とし、LA-Taq DNAポリメラー

ぜ(宝酒造社)を用いてPCRを行なった。フォワードプライマーとして、配列番号11で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、リバープライマーとして、配列番号12で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。PCR条件は、94℃(2分間)の後、94℃(30秒間)、50℃(30秒間)、及び72℃(1分間)からなるサイクルを35回繰り返した。

その結果、約0.5kbpのDNA断片が、扁桃核、尾状核、海馬、脳梁、黒質、視床、小脳、前頭葉、視床下部、脊髄、脳下垂体、全脳、心臓、胎盤、肺、気管支、肝臓、骨格筋、腎臓、すい臓、小腸、胃、脾臓、骨髄、胸腺、甲状腺、唾液腺、副腎、乳腺、前立腺、精巣、子宮、胎児脳、胎児腎臓、胎児肝臓、及び胎児肺に由来するcDNAで増幅された。この結果から、GPRg1bは、摂食機能に関連しない様々な組織で発現していることが判明した。

《実施例5 HEK293-EBNA細胞におけるGPRg1タンパク質の発現による細胞内情報伝達系の解析》

実施例1でクローニングしたGPRg1の全長cDNAを、フォワードプライマーとして、配列番号13で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、リバープライマーとして、配列番号14で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて、パイロベストDNAポリメラーゼ(宝酒造社)によるPCRを行なうことにより増幅した。PCR産物を制限酵素XbaI及びSpeIで処理し、pEF-BOS(前述④Mizushima, S及びら)のXbaI部位に挿入した(以下、得られたプラスミドを、プラスミドpEF-BOS-SSF-GPRg1と称する)。前記プラスミドpEF-BOS-SSF-GPRg1によれば、N末端にシグナルシーケンスを付加したGPRg1タンパク質を発現させることができるため、目的ポリペプチドを細胞膜に高頻度に発現させることができる。

一方、G α タンパク質の一種であるGqとGiとのキメラタンパク質Gqi5を、Conklin, B. R. らの方法(⑤Nature, 363, 274-276, 1993)に従って、Gq(GenBank Acc No. XM_040974)のC末端側の5アミノ酸(EYNLV;配列番号15)をGiのC末端の5アミノ酸(DCGLF;配列番号16)に置換することにより構築し、pEF-BOSにクローニングした(以下、構築したプラスミドを、プラスミドpEF-BOS-Gqi5と称する)。同様の方法で、GqとGoとのキメラタンパク質Gqo、GqとGsとのキメラタンパク質Gqs、Gq、及び

G15 (Genbank Acc No. BC011098) についても、それぞれ、プラスミド pEF-BOS にクローニングした (得られた各プラスミドを、pEF-BOS-Gqo、pEF-BOS-Gqs、pEF-BOS-Gq、及び pEF-BOS-G15 と称する)。

具体的には、プラスミド pEF-BOS-Gqi5 は、鑄型として、Gq をコードする cDNA を含むプラスミド (前述⑤Nature) を、フォワードプライマーとして、配列番号17で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、リバープライマーとして、配列番号18で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて増幅したPCR産物を、制限酵素 SpeI で処理し、プラスミド pEF-BOS の XbaI 部位に挿入することにより、調製した。

プラスミド pEF-BOS-Gq は、鑄型として、Gq をコードする cDNA を含むプラスミドを、フォワードプライマーとして、配列番号17で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、リバープライマーとして、配列番号19で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて増幅したPCR産物を、制限酵素 SpeI で処理し、プラスミド pEF-BOS の XbaI 部位に挿入することにより、調製した。

プラスミド pEF-BOS-G15 は、鑄型として、G15 をコードする cDNA を含むプラスミドを、フォワードプライマーとして、配列番号20で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、リバープライマーとして、配列番号21で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて増幅したPCR産物を、制限酵素 XbaI で処理し、プラスミド pEF-BOS の XbaI 部位に挿入することにより、調製した。

コラーゲンタイプ I をコーティングした24ウェルプレート

(Collagen-Type I-Coated 24 well plate; ASAHI TECHNO GLASS 社) に、HEK293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社) を1ウェル当たり 7×10^4 細胞となるように播種し、24時間培養した後、(1) プラスミド pEF-BOS-SSF-GPRg1 又は プラスミド pEF-BOS (コントロールとしての空ベクター) (1ウェル当たり 100ng) と、(2) 各プラスミド pEF-BOS-Gqi5、pEF-BOS-Gqo、pEF-BOS-Gqs、pEF-BOS-Gq、又は pEF-BOS-G15 のいずれか1種類のプラスミド (1ウェル当たり 100ng) と、(3) プラスミド pSRE-luc (STRATAGENE 社) (1ウェル当たり 20ng) とを、遺伝子導入試薬 (FuGENE™6 Transfection Reagent; Roche Diagnostics 社製) を用いて、3者同時に遺伝子導入した。遺伝子導入から24時間経過した後、培地を廃棄し、ルシフェラーゼ・アッセイシステム (和光純薬社) の方法に

従い、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定した。

結果を図1に示す。図1に示すように、プラスミドpEF-BOS-SSF-GPRg1及びプラスミドpSRE-lucと一緒に、プラスミドpEF-BOS-Gqi5又はプラスミドpEF-BOS-Gqを導入した細胞では、細胞内ルシフェラーゼ活性が特異的に上昇しており、GPRg1タンパク質のセカンドメッセンジャーは、 Ca^{2+} 上昇及び／又はcAMP抑制であることが判明した。

産業上の利用可能性

本発明のポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び前記発現ベクターを含む細胞は、摂食障害及び／又は肥満症治療剤として有効な物質のスクリーニングに有用である。

配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artifitial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号13、14、17～21の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

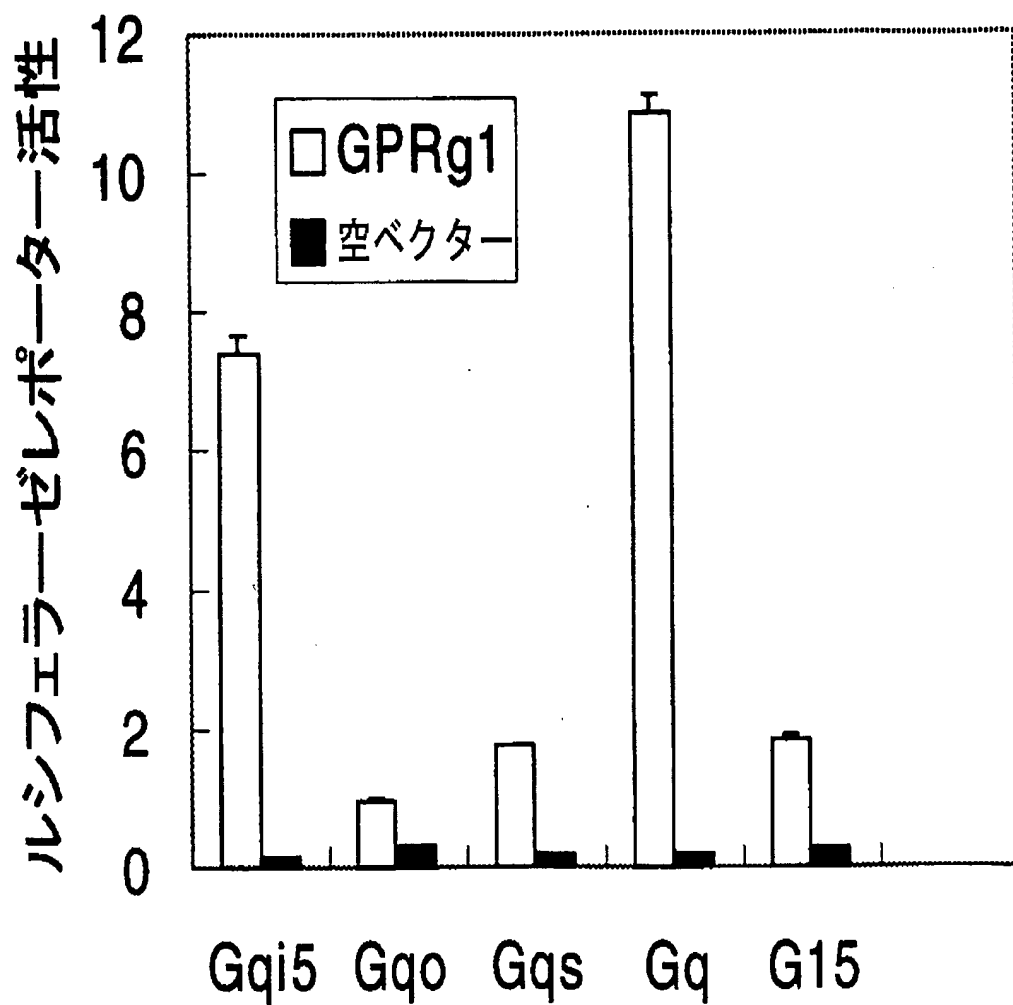
請求の範囲

1. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、(a)細胞において活性化されることにより、前記細胞内 Ca^{2+} 量を増加させる活性、及び／又は(b)細胞において活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を減少させる活性を示すポリペプチド、あるいは、
(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列の1～5個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、(a)細胞において活性化されることにより、前記細胞内 Ca^{2+} 量を増加させる活性、及び／又は(b)細胞において活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を減少させる活性を示すポリペプチド。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
3. 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
4. 請求の範囲1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
5. 請求の範囲4に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
6. 請求の範囲5に記載のベクターを含む細胞。
7. 請求の範囲6に記載の細胞を培養する工程を含むことを特徴とする、請求の範囲1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドを製造する方法。
8. 請求の範囲1又は2に記載のポリペプチドを発現している細胞又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む前記ポリペプチドの活性を制御できる物質をスクリーニングする方法。
9. (1) 請求の範囲1又は2に記載のポリペプチドを発現している細胞又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、および、
(2) 請求の範囲3に記載のポリペプチドを発現している細胞又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む、請求の範囲1又は2に記載のポリペプチドの活性を制御

できる物質であって、しかも、請求の範囲 3 に記載のポリペプチドの活性に影響を与えない物質をスクリーニングする方法。

1/1

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel G protein-coupled receptor

<130> Y0227-PCT

<150>JP 2001-288278

<151>2001-09-21

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1062

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1062)

<220>

<223> Inventor:Matsumoto, Shunichiro;Takasaki, Jun;Kurama, Takeshi;Saito, Tetsu
Inventor:Kamohara, Masazumi;Soga, Takatoshi;Hiyama, Hideki

<400> 1

atg gag cac acg cac gcc cac ctc gca gcc aac agc tcg ctg tct tgg 48
Met Glu His Thr His Ala His Leu Ala Ala Asn Ser Ser Leu Ser Trp
1 5 10 15

tgg tcc ccc ggc tcg gcc tgc ggc ttg ggt ttc gtg ccc gtg gtc tac 96
Trp Ser Pro Gly Ser Ala Cys Gly Leu Gly Phe Val Pro Val Val Tyr
20 25 30

tac agc ctc ttg ctg tgc ctc ggt tta cca gca aat atc ttg aca gtg 144
Tyr Ser Leu Leu Leu Cys Leu Gly Leu Pro Ala Asn Ile Leu Thr Val

35	40	45	
atc atc ctc tcc cag ctg gtg gca aga aga cag aag tcc tcc tac aac			192
Ile Ile Leu Ser Gln Leu Val Ala Arg Arg Gln Lys Ser Ser Tyr Asn			
50	55	60	
tat ctc ttg gca ctc gct gct gcc gac atc ttg gtc ctc ttt ttc ata			240
Tyr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ile Leu Val Leu Phe Phe Ile			
65	70	75	80
gtg ttt gtg gac ttc ctg ttg gaa gat ttc atc ttg aac atg cag atg			288
Val Phe Val Asp Phe Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Asn Met Gln Met			
85	90	95	
cct cag gtc ccc gac aag atc ata gaa gtg ctg gaa ttc tca tcc atc			336
Pro Gln Val Pro Asp Lys Ile Ile Glu Val Leu Glu Phe Ser Ser Ile			
100	105	110	
cac acc tcc ata tgg att act gta ccg tta acc att gac agg tat atc			384
His Thr Ser Ile Trp Ile Thr Val Pro Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Ile			
115	120	125	
gct gtc tgc cac ccg ctc aag tac cac acg gtc tca tac cca gcc cgc			432
Ala Val Cys His Pro Leu Lys Tyr His Thr Val Ser Tyr Pro Ala Arg			
130	135	140	
acc cgg aaa gtc att gta agt gtt tac atc acc tgc ttc ctg acc agc			480
Thr Arg Lys Val Ile Val Ser Val Tyr Ile Thr Cys Phe Leu Thr Ser			
145	150	155	160
atc ccc tat tac tgg tgg ccc aac atc tgg act gaa gac tac atc agc			528
Ile Pro Tyr Tyr Trp Trp Pro Asn Ile Trp Thr Glu Asp Tyr Ile Ser			
165	170	175	
acc tct gtg cat cac gtc ctc atc tgg atc cac tgc ttc acc gtc tac			576
Thr Ser Val His His Val Leu Ile Trp Ile His Cys Phe Thr Val Tyr			
180	185	190	
ctg gtg ccc tgc tcc atc ttc ttc atc ttg aac tca atc att gtg tac			624
Leu Val Pro Cys Ser Ile Phe Phe Ile Leu Asn Ser Ile Ile Val Tyr			

195	200	205	
aag ctc agg agg aag agc aat ttt cgt ctc cgt ggc tac tcc acg ggg			672
Lys Leu Arg Arg Lys Ser Asn Phe Arg Leu Arg Gly Tyr Ser Thr Gly			
210	215	220	
aag acc acc gcc atc ttg ttc acc att acc tcc atc ttt gcc aca ctt			720
Lys Thr Thr Ala Ile Leu Phe Thr Ile Thr Ser Ile Phe Ala Thr Leu			
225	230	235	240
tgg gcc ccc cgc atc atc atg att ctt tac cac ctc tat ggg gcg ccc			768
Trp Ala Pro Arg Ile Ile Met Ile Leu Tyr His Leu Tyr Gly Ala Pro			
245	250	255	
atc cag aac cgc tgg ctg gta cac atc atg tcc gac att gcc aac atg			816
Ile Gln Asn Arg Trp Leu Val His Ile Met Ser Asp Ile Ala Asn Met			
260	265	270	
cta gcc ctt ctg aac aca gcc atc aac ttc ttc ctc tac tgc ttc atc			864
Leu Ala Leu Leu Asn Thr Ala Ile Asn Phe Phe Leu Tyr Cys Phe Ile			
275	280	285	
agc aag cgg ttc cgc acc atg gca gcc gcc acg ctc aag gct ttc ttc			912
Ser Lys Arg Phe Arg Thr Met Ala Ala Ala Thr Leu Lys Ala Phe Phe			
290	295	300	
aag tgc cag aag caa cct gta cag ttc tac acc aat cat aac ttt tcc			960
Lys Cys Gln Lys Gln Pro Val Gln Phe Tyr Thr Asn His Asn Phe Ser			
305	310	315	320
ata aca agt agc ccc tgg atc tgc ccg gca aac tca cac tgc atc aag			1008
Ile Thr Ser Ser Pro Trp Ile Ser Pro Ala Asn Ser His Cys Ile Lys			
325	330	335	
atg ctg gtg tac cag tat gac aaa aat gga aaa cct ata aaa gta tcc			1056
Met Leu Val Tyr Gln Tyr Asp Lys Asn Gly Lys Pro Ile Lys Val Ser			
340	345	350	
ccg tga			1062
Pro			

<210> 2

<211> 353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Glu His Thr His Ala His Leu Ala Ala Asn Ser Ser Leu Ser Trp
  1             5             10             15
Trp Ser Pro Gly Ser Ala Cys Gly Leu Gly Phe Val Pro Val Val Tyr
      20             25             30
Tyr Ser Leu Leu Leu Cys Leu Gly Leu Pro Ala Asn Ile Leu Thr Val
      35             40             45
Ile Ile Leu Ser Gln Leu Val Ala Arg Arg Gln Lys Ser Ser Tyr Asn
      50             55             60
Tyr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ile Leu Val Leu Phe Phe Ile
      65             70             75             80
Val Phe Val Asp Phe Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Asn Met Gln Met
      85             90             95
Pro Gln Val Pro Asp Lys Ile Ile Glu Val Leu Glu Phe Ser Ser Ile
      100            105            110
His Thr Ser Ile Trp Ile Thr Val Pro Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Ile
      115            120            125
Ala Val Cys His Pro Leu Lys Tyr His Thr Val Ser Tyr Pro Ala Arg
      130            135            140
Thr Arg Lys Val Ile Val Ser Val Tyr Ile Thr Cys Phe Leu Thr Ser
      145            150            155            160
Ile Pro Tyr Tyr Trp Trp Pro Asn Ile Trp Thr Glu Asp Tyr Ile Ser
      165            170            175
Thr Ser Val His His Val Leu Ile Trp Ile His Cys Phe Thr Val Tyr
      180            185            190
Leu Val Pro Cys Ser Ile Phe Phe Ile Leu Asn Ser Ile Ile Val Tyr
      195            200            205
Lys Leu Arg Arg Lys Ser Asn Phe Arg Leu Arg Gly Tyr Ser Thr Gly
      210            215            220
Lys Thr Thr Ala Ile Leu Phe Thr Ile Thr Ser Ile Phe Ala Thr Leu
      225            230            235            240
Trp Ala Pro Arg Ile Ile Met Ile Leu Tyr His Leu Tyr Gly Ala Pro
      245            250            255

```

5/13

Ile Gln Asn Arg Trp Leu Val His Ile Met Ser Asp Ile Ala Asn Met
 260 265 270
 Leu Ala Leu Leu Asn Thr Ala Ile Asn Phe Phe Leu Tyr Cys Phe Ile
 275 280 285
 Ser Lys Arg Phe Arg Thr Met Ala Ala Ala Thr Leu Lys Ala Phe Phe
 290 295 300
 Lys Cys Gln Lys Gln Pro Val Gln Phe Tyr Thr Asn His Asn Phe Ser
 305 310 315 320
 Ile Thr Ser Ser Pro Trp Ile Ser Pro Ala Asn Ser His Cys Ile Lys
 325 330 335
 Met Leu Val Tyr Gln Tyr Asp Lys Asn Gly Lys Pro Ile Lys Val Ser
 340 345 350
 Pro

<210> 3

<211> 1125

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1125)

<400> 3

atg ctg aca ggg agc tgc ggg gac cct cag aaa aag cca cag gtg acc 48
 Met Leu Thr Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gln Lys Lys Pro Gln Val Thr
 1 5 10 15

cag gac tca ggg ccc cag agc atg ggg ctt gag gga cga gag aca gct 96
 Gln Asp Ser Gly Pro Gln Ser Met Gly Leu Glu Gly Arg Glu Thr Ala
 20 25 30

ggc cag cca cga gtg acc ctg ctg ccc acg ccc aac gtc agc ggg ctg 144
 Gly Gln Pro Arg Val Thr Leu Leu Pro Thr Pro Asn Val Ser Gly Leu
 35 40 45

agc cag gag ttt gaa agc cac tgg cca gag atc gca gag agg tcc ccg 192
 Ser Gln Glu Phe Glu Ser His Trp Pro Glu Ile Ala Glu Arg Ser Pro
 50 55 60

tgt gtg gct ggc gtc atc cct gtc atc tac tac agt gtc ctg ctg ggc 240
Cys Val Ala Gly Val Ile Pro Val Ile Tyr Tyr Ser Val Leu Leu Gly
65 70 75 80

ttg ggg ctg cct gtc agc ctc ctg acc gca gtg gcc ctg gcg cgc ctt 288
Leu Gly Leu Pro Val Ser Leu Leu Thr Ala Val Ala Leu Ala Arg Leu
85 90 95

gcc acc agg acc agg agg ccc tcc tac tac tac ctt ctg gcg ctc aca 336
Ala Thr Arg Thr Arg Arg Pro Ser Tyr Tyr Tyr Leu Leu Ala Leu Thr
100 105 110

gcc tcg gat atc atc atc cag gtg gtc atc gtg ttc gcg ggc ttc ctc 384
Ala Ser Asp Ile Ile Ile Gln Val Val Ile Val Phe Ala Gly Phe Leu
115 120 125

ctg cag gga gca gtg ctg gcc cgc cag gtg ccc cag gct gtg gtg cgc 432
Leu Gln Gly Ala Val Leu Ala Arg Gln Val Pro Gln Ala Val Val Arg
130 135 140

acg gcc aac atc ctg gag ttt gct gcc aac cac gcc tca gtc tgg atc 480
Thr Ala Asn Ile Leu Glu Phe Ala Ala Asn His Ala Ser Val Trp Ile
145 150 155 160

gcc atc ctg ctc acg gtt gac cgc tac act gcc ctg tgc cac ccc ctg 528
Ala Ile Leu Leu Thr Val Asp Arg Tyr Thr Ala Leu Cys His Pro Leu
165 170 175

cac cat cgg gcc gcc tcg tcc cca ggc cgg acc cgc cgg gcc att gct 576
His His Arg Ala Ala Ser Ser Pro Gly Arg Thr Arg Arg Ala Ile Ala
180 185 190

gct gtc ctg agt gct gcc ctg ttg acc ggc atc ccc ttc tac tgg tgg 624
Ala Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu Thr Gly Ile Pro Phe Tyr Trp Trp
195 200 205

ctg gac atg tgg aga gac acc gac tca ccc aga aca ctg gac gag gtc 672
Leu Asp Met Trp Arg Asp Thr Asp Ser Pro Arg Thr Leu Asp Glu Val
210 215 220

ctc aag tgg gct cac tgt ctc act gtc tat ttc atc cct tgt ggc gtg 720
 Leu Lys Trp Ala His Cys Leu Thr Val Tyr Phe Ile Pro Cys Gly Val
 225 230 235 240

ttc ctg gtc acc aac tcg gcc atc atc cac cgg cta cgg agg agg ggc 768
 Phe Leu Val Thr Asn Ser Ala Ile Ile His Arg Leu Arg Arg Arg Gly
 245 250 255

cgg agt ggg ctg cag ccc cgg gtg ggc aag agc aca gcc atc ctc ctg 816
 Arg Ser Gly Leu Gln Pro Arg Val Gly Lys Ser Thr Ala Ile Leu Leu
 260 265 270

ggc atc acc aca ctg ttc acc ctc ctg tgg gcg ccc cgg gtc ttc gtc 864
 Gly Ile Thr Thr Leu Phe Thr Leu Leu Trp Ala Pro Arg Val Phe Val
 275 280 285

atg ctc tac cac atg tac gtg gcc cct gtc cac cgg gac tgg agg gtc 912
 Met Leu Tyr His Met Tyr Val Ala Pro Val His Arg Asp Trp Arg Val
 290 295 300

cac ctg gcc ttg gat gtg gcc aac atg gtg gcc atg ctc cac acg gca 960
 His Leu Ala Leu Asp Val Ala Asn Met Val Ala Met Leu His Thr Ala
 305 310 315 320

gcc aac ttc ggc ctc tac tgc ttt gtc agc aag act ttc cgg gcc act 1008
 Ala Asn Phe Gly Leu Tyr Cys Phe Val Ser Lys Thr Phe Arg Ala Thr
 325 330 335

gtc cga cag gtc atc cac gat gcc tac ctg ccc tgc act ttg gca tca 1056
 Val Arg Gln Val Ile His Asp Ala Tyr Leu Pro Cys Thr Leu Ala Ser
 340 345 350

cag cca gag ggc atg gcg gcg aag cct gtg atg gag cct ccg gga ctc 1104
 Gln Pro Glu Gly Met Ala Ala Lys Pro Val Met Glu Pro Pro Gly Leu
 355 360 365

ccc aca ggg gca gaa gtg tag 1125
 Pro Thr Gly Ala Glu Val
 370 375

<210> 4

<211> 374

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Leu Thr Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gln Lys Lys Pro Gln Val Thr
  1             5             10             15
Gln Asp Ser Gly Pro Gln Ser Met Gly Leu Glu Gly Arg Glu Thr Ala
      20             25             30
Gly Gln Pro Arg Val Thr Leu Leu Pro Thr Pro Asn Val Ser Gly Leu
      35             40             45
Ser Gln Glu Phe Glu Ser His Trp Pro Glu Ile Ala Glu Arg Ser Pro
      50             55             60
Cys Val Ala Gly Val Ile Pro Val Ile Tyr Tyr Ser Val Leu Leu Gly
      65             70             75             80
Leu Gly Leu Pro Val Ser Leu Leu Thr Ala Val Ala Leu Ala Arg Leu
      85             90             95
Ala Thr Arg Thr Arg Arg Pro Ser Tyr Tyr Tyr Leu Leu Ala Leu Thr
      100            105            110
Ala Ser Asp Ile Ile Ile Gln Val Val Ile Val Phe Ala Gly Phe Leu
      115            120            125
Leu Gln Gly Ala Val Leu Ala Arg Gln Val Pro Gln Ala Val Val Arg
      130            135            140
Thr Ala Asn Ile Leu Glu Phe Ala Ala Asn His Ala Ser Val Trp Ile
      145            150            155            160
Ala Ile Leu Leu Thr Val Asp Arg Tyr Thr Ala Leu Cys His Pro Leu
      165            170            175
His His Arg Ala Ala Ser Ser Pro Gly Arg Thr Arg Arg Ala Ile Ala
      180            185            190
Ala Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu Thr Gly Ile Pro Phe Tyr Trp Trp
      195            200            205
Leu Asp Met Trp Arg Asp Thr Asp Ser Pro Arg Thr Leu Asp Glu Val
      210            215            220
Leu Lys Trp Ala His Cys Leu Thr Val Tyr Phe Ile Pro Cys Gly Val
      225            230            235            240
Phe Leu Val Thr Asn Ser Ala Ile Ile His Arg Leu Arg Arg Arg Gly
      245            250            255

```

9/13

Arg Ser Gly Leu Gln Pro Arg Val Gly Lys Ser Thr Ala Ile Leu Leu
 260 265 270
 Gly Ile Thr Thr Leu Phe Thr Leu Leu Trp Ala Pro Arg Val Phe Val
 275 280 285
 Met Leu Tyr His Met Tyr Val Ala Pro Val His Arg Asp Trp Arg Val
 290 295 300
 His Leu Ala Leu Asp Val Ala Asn Met Val Ala Met Leu His Thr Ala
 305 310 315 320
 Ala Asn Phe Gly Leu Tyr Cys Phe Val Ser Lys Thr Phe Arg Ala Thr
 325 330 335
 Val Arg Gln Val Ile His Asp Ala Tyr Leu Pro Cys Thr Leu Ala Ser
 340 345 350
 Gln Pro Glu Gly Met Ala Ala Lys Pro Val Met Glu Pro Pro Gly Leu
 355 360 365
 Pro Thr Gly Ala Glu Val
 370

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atggagcaca cgcacgccca cctcgcag

28

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tcacggggat acttttatag gttttcca

28

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgctgacag ggagctgcgg ggaccctc

28

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ctacacttct gcccctgtgg ggagtc

28

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

tgcacacgt cctcatctgg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gatgcagtgt gagtttgccg

20

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gaccgctaca ctgccctgtg ccaccccc

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ggaaagtctt gctgacaaag cagtagag

28

<210> 13

<211> 116

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 13

ctagactagt atgaagacga tcatcgccct gagctacatc ttctgcctgg tattcgccga 60
ctacaaggac gatgatgaca agtctagaat ggagcacacg cacgccacc tcgcag 116

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 14

ctagtctaga tcacgggat acttttatag gttttcca

38

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

12/13

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Tyr Asn Leu Val

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asp Cys Gly Leu Phe

1 5

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 17

ctagactagt atgactctgg agtccatcat ggcgtgct

38

<210> 18

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 18

ctagactagt ttaaaagaga ccacaatcct tcaggttcaa ctggaggatg gtgtcc 56

<210> 19

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 19

ctagactagt ttagaccaga ttgtactcct tcaggttc 38

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 20

ctagtctaga atggcccggt ccctgacttg gggetgct 38

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 21

ctagtctaga tcacagcagg ttgatctcgt ccaggtac 38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09626

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N5/10, C12N15/12, C12N15/63, C12Q1/02,
G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N5/10, C12N15/12, C12N15/63, C12Q1/02,
G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X/ P, A	WO 01/70978 A2 (CURAGEN CORP.), 27 September, 2001 (27.09.01), & AU 04592001 A	1-2, 4-9/ 3
P, X/ P, A	WO 01/94582 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 13 December, 2001 (13.12.01), & AU 06069101 A	1-2, 4-9/ 3
P, X/ P, A	WO 02/10387 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 07 February, 2002 (07.02.02), (Family: none)	3-9/ 1-2
P, A	WO 01/96592 A1 (MERCK PATENT GMBH), 20 December, 2001 (20.12.01), (Family: none)	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 December, 2002 (10.12.02)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2002 (24.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09626

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 01/98330 A2 (EUROSCREEN S.A.), 27 December, 2001 (27.12.01), (Family: none)	1-9
P, A	WO 02/06466 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 24 January, 2002 (24.01.02), (Family: none)	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/09626

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N5/10, C12N15/12, C12N15/63, C12Q1/02,
G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N5/10, C12N15/12, C12N15/63, C12Q1/02,
G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX/ PA	WO 01/70978 A2 (CURAGEN CORPORATION) 2001.09.27 & AU 04592001 A	1-2, 4-9/ 3
PX/ PA	WO 01/94582 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.,) 2001.12.13 & AU 06069101 A	1-2, 4-9/ 3
PX/ PA	WO 02/10387 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.,) 2002.02.07 (ファミリーなし)	3-9/ 1-2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行人若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.12.02

国際調査報告の発送日

24.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区蔵が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P A	WO 01/96592 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2001. 12. 20 (ファミリーなし)	1 - 9
P A	WO 01/98330 A2 (EUROSCREEN S. A.) 2001. 12. 27 (ファミリーなし)	1 - 9
P A	WO 02/06466 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.,) 2002. 01. 24 (ファミリーなし)	1 - 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P A	WO 01/96592 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2001.12.20 (ファミリーなし)	1 - 9
P A	WO 01/98330 A2 (EUROSCREEN S. A.) 2001.12.27 (ファミリーなし)	1 - 9
P A	WO 02/06466 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.,) 2002.01.24 (ファミリーなし)	1 - 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.